農用微生物應用於苦瓜萎凋病之防治效果評估

陳星妤、洪素秋、鄭櫻慧、曹麗玉

農業部農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護暨園產品加工系

摘要

萎凋病主要由 *Fusarium oxysporum* 引起，為多種經濟作物常見病害，會導致作物萎凋死亡，造成全球農業嚴重經濟損失，目前台灣多數作物尚無針對萎凋病的推薦化學藥劑，且長期使用化學藥劑可能產生抗藥性病原菌和食安問題，故本研究旨在評估市售農用微生物製劑和 *Streptomyces lavenduligriseus* L2 搭配 SH 土壤添加物對苦瓜萎凋病之防治效果，期望開發環境友善且具應用潛力的萎凋病綜合防治策略。拮抗試驗結果顯示，市售微生物製劑－神真水 3 號和 *S. lavenduligriseus* L2 分別可抑制 40% 和 42% *F. oxysporum* 菌絲生長，植株試驗則發現 400 倍和 800 倍稀釋之神真水 3 號分別搭配 SH 土壤添加物處理組與病原菌對照組相比，其苦瓜萎凋病罹病度分別減少 75% 和 68%，10 倍和 25 倍稀釋之 *S. lavenduligriseus* L2 分別搭配 SH 土壤添加物處理組與病原菌對照組相比，其苦瓜萎凋病罹病度皆減少 85%，前述 4 種處理組防治效果皆優於 SH 土壤添加物單獨處理組。進一步探討施用時機，將神真水 3 號於苦瓜育苗期施用 1 週後，將植株移盆至含 SH 添加物的土壤中，結果顯示苦瓜萎凋病罹病度比病原菌對照組下降 59%，其防治效果僅次於移盆後每週澆灌 800 倍稀釋的神真水 3 號。綜合上述結果，神真水 3 號和 *S. lavenduligriseus* L2 搭配 SH 土壤添加物可有效防治苦瓜萎凋病，未來將持續探討其最佳施用時機與條件，以建立兼具環境友善與應用性的萎凋病綜合防治策略。

關鍵詞：萎凋病、生物防治、神真水 3 號、SH 土壤添加物、*Fusarium oxysporum*、*Streptomyces lavenduligriseus*

緒言

植物萎凋病可分為細菌性及真菌性兩大類，細菌性萎凋病菌包括造成康乃馨萎凋病之 *Burkholderia caryophylli* (Kawanishi *et al*., 2009) 及引起玉米萎凋病之 *Pantoea stewartia* (Stewart, 1897) 等，真菌性萎凋病菌則包含造成棉花萎凋病之 *Verticillium dahliae* (Pullman and DeVay, 1982) 及導致多種作物萎凋病之 *Fusarium oxysporum* (Di Pietro *et al*., 2003) 等。

F. oxysporum 為一種常見的土壤傳播性病原菌，隸屬於真菌界子囊菌門鐮胞菌屬 (*Fusarium*)，菌落於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato dextrose agar;

PDA) 培養初期菌絲為白色，隨時間推移通常轉為紫色，可產生 3 種孢子，分別為橢圓形的小分生孢子 (Microconidia)、鐮刀狀的大分生孢子 (Macroconidia)，和球形的厚膜孢子 (Chlamydospores) (Jeon *et al.*, 2013)。該病原菌孢子可存在於土壤中，受植物根系分泌物誘導而發芽，透過根尖或根部傷口侵入寄主植物，定殖於維管束中，並產生孢子促進感染擴散，同時分泌胞外酵素分解細胞壁及中膠層，使寄主細胞結構鬆散利於病原菌入侵。該菌亦會釋放毒素干擾植物酵素合成和細胞膜穩定性，抑制寄主抗性並促使細胞凋亡，此外該菌產生之多醣會增加植物維管束中液體黏性造成阻塞，導致寄主水分輸送受阻。*F. oxysporum* 亦可生合成植物生長調節劑，如吲哚乙酸 (Indole-3-acetic acid; IAA)，並與寄主防禦反應產生的 IAA 相互作用，造成 IAA 異常累積，誘發維管束周圍細胞異常增生，加劇維管束阻塞 (Dimond, 1970；Gordon, 2017)。以苦瓜為例，植株感染萎凋病初期會於下位葉葉脈出現黃化 (圖 1 A)、葉片呈現失水萎凋狀 (圖 1 B)，病徵逐漸向上蔓延，導致整個植株葉片黃化和萎凋 (圖 1 C)，莖部剖面可見維管束褐化病徵 (圖 1 D)，最終死亡。*F. oxysporum* 通常具高度寄主專一性，並有多種分化型，如苦瓜萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *momordicae* (Sun and Huang, 1983)、洋桔梗萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *eustomae* (Wu *et al.*, 2023)，及香蕉萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Ploetz, 2015) 等，故其寄主範圍廣泛，可引起多種經濟作物病害，造成農業嚴重損失，且於 2012 年被 Molecular Plant Pathology 相關科學家評選為十大具科學及經濟重要性的真菌病原菌之一 (Dean *et al.*, 2012)。

F. oxysporum 引起的真菌性萎凋病為土傳性病害，且寄主專一性高，依此特性可藉由輪作或種植前使用土壤燻蒸劑，並避免作物栽種於土壤排水不良的低窪地區，維持土壤酸鹼值於 6 至 7，降低病原菌於土壤中的族群密度，亦可選擇抗病品種進行種植或作為嫁接的根砧 (何，2003；湯等，2019)。作物種植後，則可採用化學殺菌劑防治萎凋病，Amini 等人 2010 年的研究指出撲克拉和溴克座可防治由 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 引起之番茄萎凋病 (Amini and Sidovich, 2010)，然而目前台灣多種作物萎凋病尚未有核准使用的化學藥劑，且長期使用同類作用機制之化學殺菌劑可能產生對藥劑具有抗性的 *F. oxysporum*，並因藥劑於果實殘留導致食安疑慮。因此，開發對環境友善的替代方法防治作物萎凋病具有重要性，生物防治是現今農業在綜合管理策略中積極推廣的方法之一，土壤添加物的應用亦有利於土傳性病害的防治，故本研究旨在探討農用微生物搭配 SH 土壤添加劑對於作物萎凋病的防治效果。

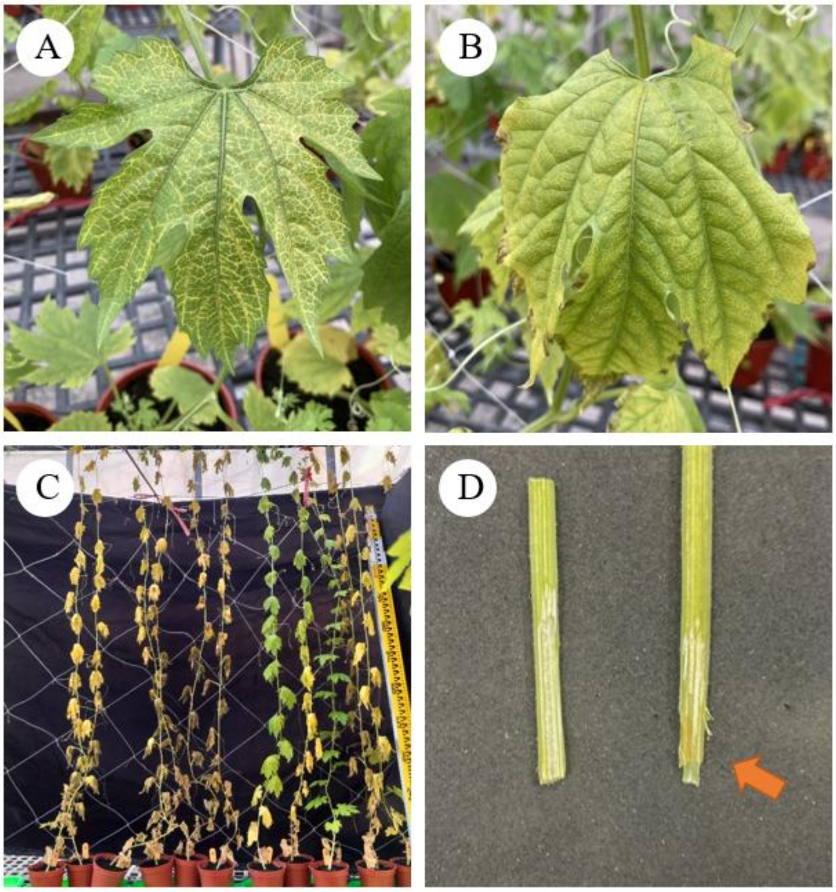

圖 1. 苦瓜萎凋病病徵。(A) 下位葉葉脈黃化，(B) 葉片失水萎凋，(C) 整個植株黃化和萎凋，(D) 左側為健康株維管束，右側為病株維管束褐化。

Fig.1. Symptoms of *Fusarium* wilt in bitter gourd. (A) Yellowing of veins in the lower leaves, (B) Leaf wilting due to loss of turgor, (C) Systemic yellowing and wilting of the plant, (D) The left shows the vascular bundle of the healthy plant, while the right shows the vascular bundle browning of the diseased plant.

微生物和土壤添加物防治萎凋病的前人研究

生物防治植物病害可透過多種機制達到減少植物病害發生的效果，主要包括有益微生物與病原菌間的營養競爭和抗菌物質的產生來抑制病原菌生長，以及誘導植物的防禦機制降低病害發病率 (Köhl *et al.*, 2019)。

Bacillus species 為目前商業上廣泛開發與應用的生物防治菌種，廣泛分布於土壤、水和植物等環境中，此類菌株可產生耐受環境逆境的內生孢子，有助於其在惡劣環境中存活，*Bacillus* 還具有生合成脂肽類抗菌物質、分解酵素和內毒素的能力，亦可誘發植物防禦反應 (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018)。Al-Mutar 等人 2023 年研究發現西瓜根際分離出的 *B. amyloliquefaciens* DHA55 可產生伊枯草菌素 (Iturin)、豐原素 (Fengycin) 和表面素 (Surfactin)，這些脂肽具有抑制 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* 菌絲生長的效果，進而防治西瓜蔓割

病 (Al-Mutar *et al.*, 2023)。

Streptomyces species 亦被視為極具潛力的農業生物防治資材，為兼具菌絲與斷生孢子的細菌，兩者結構有助於其定殖和生長於不同基質，並具有良好的環境耐受性，該菌可產生多種具抗菌活性的二次代謝物和分解酵素，尤其以抗生素產能著稱，在誘導植物對病原菌抗性方面 *Streptomyces* 亦具有一定效果 (Pacios-Michelena *et al.*, 2021)。Kawicha 等人 2023 年研究顯示 *Streptomyces* sp. STRM104 和 STRM304 的培養濾液可有效抑制 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 和 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 的菌絲生長，藉此降低番茄萎凋病與香蕉黃葉病的罹病度 (Kawicha *et al.*, 2023)。

土壤添加物在傳統農業中多被用來提升土壤肥力供應作物養分，1970 年後逐漸關注其植物病害防治方面的潛力，主要可透過 3 種機制抑制植物病原菌，進而降低病害的發生率，包含增加養分來源提升植株健康狀態、直接降低土壤中病原菌族群密度，以及誘導根圈有益微生物生長，增強土壤微生物多樣性與穩定性。在台灣，針對 *Fusarium* 引起之植物病害，1983 年孫守恭與黃振文開發之 SH 土壤添加物已被證實具有防治效果，研究指出 SH 土壤添加物可有效防治 *F. oxysporum* 引起的西瓜蔓割病和豌豆萎凋病，以及 *F. solani* 引起的碗豆根腐病 (李，2005；孫，1989)。

農用微生物搭配土壤添加物有助於防治萎凋病

一. 農用微生物對萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* 之拮抗性測試

為初步篩選出具防治潛力之微生物菌株，本試驗選用多種市售微生物製劑，以及農業試驗所湯佳蓉助理研究員所分離之 *Streptomyces lavenduligriseus* L2，進行與萎凋病菌 *F. oxysporum* 的對峙試驗，以評估有益微生物對 *F. oxysporum* 的拮抗活性。實驗方法首先將 *F. oxysporum* 菌絲塊接種於 PDA 培養基中央，並於其四周等距放置 4 個紙錠 (paper disc)，其中 1 個紙錠加入 50 µl 無菌水作為對照組，其餘 3 個紙錠各加入 50 µl 不同濃度之微生物製劑，濃度分別為市售微生物製劑 1 / 2 倍建議用量、建議用量和 2 倍建議用量；L2 菌株則分別為 500 倍、1000 倍和 2000 倍稀釋濃度，於室溫靜置培養 7 天，測量對照組與處理組菌絲長度，並依下列公式計算抑制率，每處理重複 3 次，試驗進行 1 次。

抑制率 (Inhibition rate) (%)

$$= \frac{\text{對照組菌絲生長半徑 (cm)} - \text{處理組菌絲生長半徑 (cm)}}{\text{對照組菌絲生長半徑 (cm)}} \times 100$$

本拮抗試驗以市售微生物製劑建議稀釋濃度之抑制率數據呈現，L2 菌株以 1000 倍稀釋之結果表示，結果顯示 600 倍稀釋的貝萊斯寶 (*Bacillus velezensis* BACY; BACY) 對 *F. oxysporum* 菌絲生長抑制率達 50%，表現出最佳拮抗活性，其餘各處理的拮抗能力由高到低依序為 250 倍稀釋的菌力寶 2 號

(*B. amyloliquefaciens* Tcba05; Taba05)、800 倍稀釋的興農寶 (*B. subtilis* Y1336; Y1336)、1000 倍稀釋的 *S. lavenduligriseus* L2 (L2)、400 倍稀釋的神真水 3 號 (*B. amyloliquefaciens* CL3; CL3)、600 倍稀釋的火山寶 (*B. amyloliquefaciens* YCMA1; YCMA1) 和 200 倍稀釋的救你一命 (*B. amyloliquefaciens* PMB01; PMB01)，抑制率分別為 49%、47%、42%、40%、39% 和 23%，而 500 倍稀釋的我是救星 (*B. subtilis* KHY8; KHY8) 和 800 倍稀釋的安心寶 (*S. candidus* Y21007; Y21007) 則對 *F. oxysporum* 不具有拮抗能力 (圖 2)。

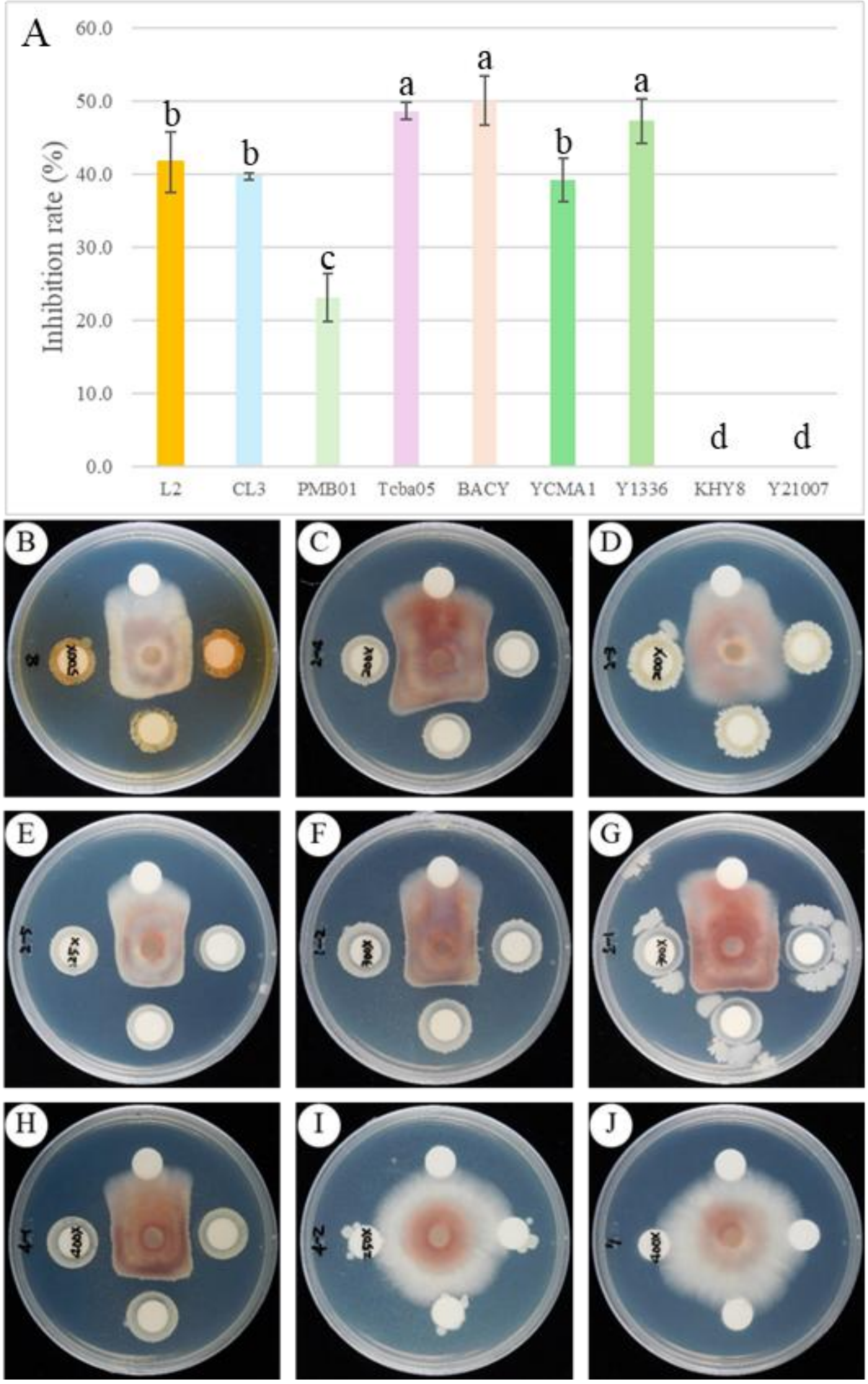

圖 2. 市售微生物製劑及 *Streptomyces lavenduligriseus* L2 對於薑凋病菌 *Fusarium oxysporum* 之拮抗能力。(A) 有益微生物對 *F. oxysporum* 的菌絲

生長抑制率，(B) 500X、1000X 和 2000X *S. lavenduligriseus* L2，(C) 200X、400X 和 800X 神真水 3 號，(D) 100X、200X 和 400X 救你一命，(E) 125X、250X 和 500X 菌力寶 2 號，(F) 300X、600X 和 1200X 貝萊斯寶，(G) 300X、600X 和 1200X 火山寶，(H) 400X、800X 和 1600X 興農寶，(I) 250X、500X 和 1000X 我是救星，(J) 400X、800X 和 1600X 安心寶對 *F. oxysporum* 菌絲生長抑制能力。(B – J) 每圖最上方之紙錠為水對照組，由左至右之紙錠依序為 1 / 2 倍建議用量、建議用量、2 倍建議用量。

Fig.2. The antagonistic activity of commercially microbial biological control agents and *Streptomyces lavenduligriseus* L2 against *Fusarium oxysporum*. (A) The mycelial growth inhibition (%) of *F. oxysporum* by effective microorganisms. The inhibition of *F. oxysporum* mycelial growth by (B) *S. lavenduligriseus* L2 at 500X, 1000X, and 2000X dilutions, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* CL3 at 200X, 400X, and 800X, (D) *B. amyloliquefaciens* PMB01 at 100X, 200X, and 400X, (E) *B. amyloliquefaciens* Tcba05 at 125X, 250X, and 500X, (F) *B. velezensis* BACY at 300X, 600X, and 1200X, (G) *B. amyloliquefaciens* YCMA1 at 300X, 600X, and 1200X, (H) *B. subtilis* Y1336 at 400X, 800X, and 1600X, (I) *B. subtilis* KHY8 at 250X, 500X, and 1000X, (J) *S. candidus* Y21007 at 400X, 800X, and 1600X. For all panels (B–J), the topmost paper disk represents the water control. The three paper disks below, from left to right, represent 1 / 2X ,1X, and 2X the recommended concentration.

二. 農用微生物對 *Fusarium oxysporum* 引起之萎凋病的防治潛力測試

根據對峙試驗初步篩選出對 *F. oxysporum* 具有拮抗活性之微生物製劑後，進一步進行植株試驗，以探討市售微生物製劑及 *S. lavenduligriseus* L2 對於作物萎凋病之防治效果。此試驗以苦瓜月華品種作為試驗植物，並以 *F. oxysporum* f. sp. *momordicae* KS0702 作為苦瓜萎凋病病原菌，實驗方法首先將苦瓜種子剝去種殼，以 0.1% 次氯酸鈉進行消毒，並以清水沖洗 2 次，置於室溫避光條件下催芽，種子發芽後播種至含培養土之 50 孔穴盤中栽培 2 週，再將苦瓜苗移盆至 4 吋盆內，於定殖當天開始每株澆灌 50 ml 處理液，每週澆灌 1 次，每處理重複 5 次，試驗進行 1 次。處理液組成包括 200 倍稀釋的即溶台肥 43 號和 0.01% Tween 80，並分別依照處理組分配混入 10 倍稀釋的 *S. lavenduligriseus* L2 (L2)、400 倍稀釋的神真水 3 號 (CL3)、200 倍稀釋的救你一命 (PMB01)、250 倍稀釋的菌力寶 2 號 (Taba05)、600 倍稀釋的貝萊斯寶 (BACY)、600 倍稀釋的火山寶 (YCMA1) 和 800 倍稀釋的興農寶 (Y1336)，另病原菌對照組 (CK) 僅澆灌含 200 倍稀釋的即溶台肥 43 號與 0.01% Tween 80 的自來水。澆灌 2 次後每株接種 100 g 含 *F. oxysporum* f. sp. *momordicae* KS0702 (10^3 spores / g) 之病土，並持續每週澆灌處理液，當第 1 株苦瓜植株出現萎凋病病徵時，開

始每日觀察和紀錄各處理組的萎凋病罹病情形，罹病程度分為 5 級：0 級為無病癥；1 級為植株中 1% 至 25% 葉片呈現葉脈與葉片黃化或枝條萎凋；2 級為植株中 26% 至 50% 葉片呈現葉脈與葉片黃化或枝條萎凋；3 級為植株中 51% 至 75% 葉片呈現葉脈與葉片黃化或枝條萎凋；4 級為 76% 以上葉片呈現葉脈與葉片黃化或枝條萎凋至植株死亡，並依下列公式計算植株罹病度，其中 n0 至 n4 為各罹病級別的植株數；N 為總植株數。

$$\text{罹病度 (Disease severity) (\%)} = \frac{n0 \times 0 + n1 \times 1 + n2 \times 2 + n3 \times 3 + n4 \times 4}{N \times 4} \times 100$$

植株試驗以 CK 罹病度達 80% 以上當天數據呈現，結果顯示苦瓜經過 400 倍稀釋的 CL3 菌株每週澆灌後，其罹病度較 CK 降低 55%，具有最佳抑制 *F. oxysporum* f. sp. momordicae KS0702 引起之苦瓜萎凋病能力，其次為 200 倍稀釋的 PMB01 菌株，施用後相較 CK 罹病度減少 30%，250 倍稀釋的 Tcba05 菌株罹病度則比 CK 減少 15%，因此在後續微生物製劑與 SH 土壤添加物搭配防治苦瓜萎凋病的試驗中，將選用此 3 種微生物製劑進行實驗。另外，10 倍稀釋的 L2 菌株在湯佳蓉助理研究員先前研究中已證實對苦瓜萎凋病具有良好防治效果，故保留此菌株並優化澆灌方法一同進行後續試驗。600 倍稀釋的 BACY 菌株雖然對 *F. oxysporum* 具有最佳拮抗活性，但在該植株試驗中卻相較 CK 反而增加苦瓜萎凋病之罹病度，因此，後續試驗仍將納入此微生物製劑，以探討其造成此現象的可能原因 (圖 3)。

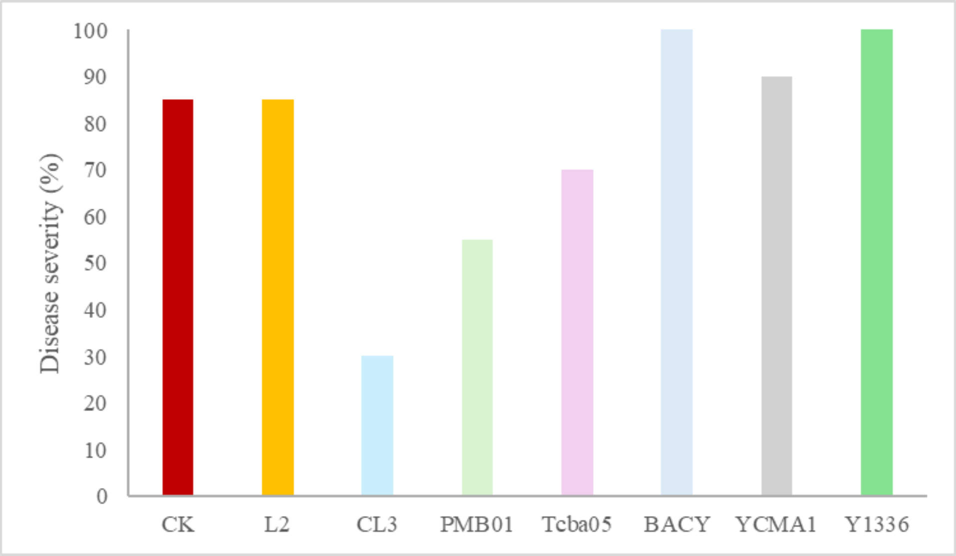

圖 3. 市售微生物製劑及 *Streptomyces lavenduligriseus* L2 對苦瓜萎凋病罹病度的影響。

Fig.3. Effect of commercial microbial biological control agents and *Streptomyces lavenduligriseus* L2 on the disease severity of *Fusarium* wilt in bitter gourd.

三. 農用微生物搭配 SH 土壤添加物對 *Fusarium oxysporum* 引起之萎凋病的防治潛力測試

根據「農用微生物對 *F. oxysporum* 引起之萎凋病的防治潛力測試」結果初步篩選出對苦瓜萎凋病具有防治效果之微生物製劑後，本試驗進一步探討市售微生物製劑及 *S. lavenduligriseus* L2 搭配 SH 土壤添加物對萎凋病之綜合防治效果。試驗材料和育苗流程與前述植株試驗方法相同，後續除病原菌對照組 (CK) 外，其他處理組均移盆至含有 0.007% SH 土壤添加物之培養土的 4 吋盆中，於定殖當天開始每株澆灌 50 ml 處理液，每週澆灌 1 次，每處理重複 7 次，試驗進行 1 次。處理液組成包括 200 倍稀釋的即溶台肥 43 號和 0.01% Tween 80，並分別依照處理組分配混入 10 倍稀釋的 *S. lavenduligriseus* L2 (10X L2 + SH)、25 倍稀釋的 *S. lavenduligriseus* L2 (25X L2 + SH)、400 倍稀釋的神真水 3 號 (CL3 + SH)、200 倍稀釋的救你一命 (PMB01 + SH)、250 倍稀釋的菌力寶 2 號 (Tcba05 + SH)、600 倍稀釋的貝萊斯寶 (BACY + SH)，其中 *S. lavenduligriseus* L2 會先泡水 1 小時活化菌株，同時靜置沉澱後，取上清液進行澆灌，另 CK 及病原菌加 SH 土壤添加物處理組 (SH) 僅澆灌含 200 倍稀釋的即溶台肥 43 號與 0.01% Tween 80 的自來水。澆灌 2 次後每株接種 100 g 含 *F. oxysporum* f. sp. *momordicae* KS0702 (10^3 spores / g) 之病土，並持續每週澆灌處理液，當第 1 株苦瓜植株出現萎凋病病徵時，開始每日觀察和紀錄各處理組的萎凋病罹病情形，並依據前述試驗 5 級評分標準搭配下列公式計算植株罹病度，其中 n0 至 n4 為各罹病級別的植株數；N 為總植株數。

$$\text{罹病度 (Disease severity) (\%)} = \frac{n0 \times 0 + n1 \times 1 + n2 \times 2 + n3 \times 3 + n4 \times 4}{N \times 4} \times 100$$

植株試驗以 CK 罹病度達 80% 以上當天數據呈現，結果顯示 SH 處理組苦瓜萎凋病罹病度較 CK 降低 46%，而 10X L2 + SH 和 25X L2 + SH 處理組皆較 CK 罹病度降低 85%，具有最佳抑制 *F. oxysporum* f. sp. *momordicae* KS0702 引起之苦瓜萎凋病能力，其次為 CL3 + SH 處理組，其罹病度相較 CK 降低 75%。另外，PMB01 + SH、Tcba05 + SH 和 BACY + SH 處理組，三者之罹病度相較 CK 分別降低 28%、32% 和 18% (圖 4)。綜合上述結果可知，L2 菌株和 CL3 菌株分別搭配 SH 土壤添加物對防治苦瓜萎凋病具有加乘效果，其中，10 倍與 25 倍稀釋的 L2 菌株分別搭配 SH 土壤添加物對防治苦瓜萎凋病效果相同，因此未來實驗將以 25 倍稀釋的 L2 菌株作為進一步研究的處理條件。

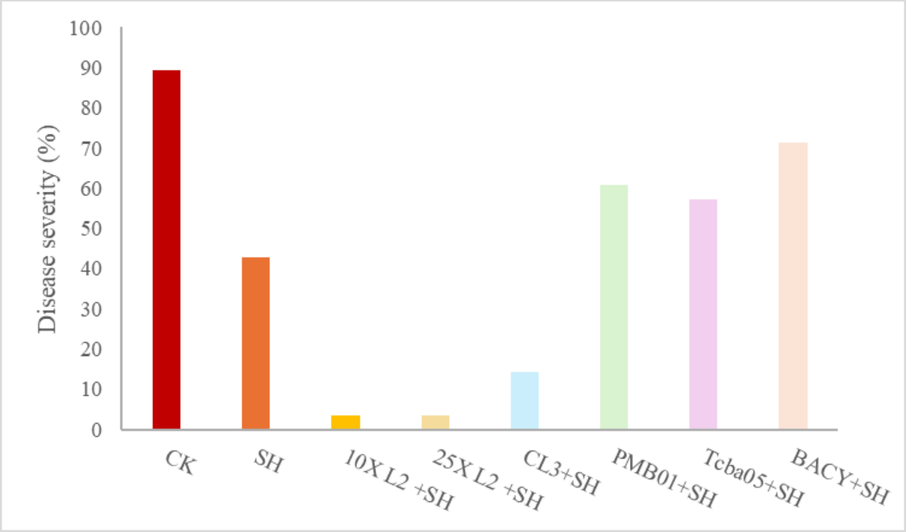

圖 4. 市售微生物製劑及 *Streptomyces lavenduligriseus* L2 搭配 SH 土壤添加物對苦瓜萎凋病罹病度的影響。

Fig.4. Effect of commercial microbial biological control agents and *Streptomyces lavenduligriseus* L2 combined with SH amendment on the disease severity of *Fusarium* wilt in bitter gourd.

四. 農用微生物搭配 SH 土壤添加物適用於防治 *Fusarium oxysporum* 引起之萎凋病的濃度測試

本研究於對峙試驗發現貝萊斯寶對於 *F. oxysporum* 具有最佳拮抗活性 (圖 2)，然而在植株試驗中卻未能有效防治苦瓜萎凋病，而是 *S. lavenduligriseus* L2 與神真水 3 號分別搭配 SH 土壤添加物對防治 *F. oxysporum* f. sp. momordicae KS0702 引起之苦瓜萎凋病具有顯著效果 (圖 5)。根據孫守恭與黃振文於 1985 年研究顯示 SH 土壤添加物可以增加土壤中拮抗菌及腐生菌族群量，間接抑制病原菌 (孫等，1985)，然而，過高濃度的單一微生物可能導致土壤微生物菌相失衡，不利於植物病害的防治，甚至因抗生物質產生過量直接對植物本身產生負面影響 (O'Callaghan *et al.*, 2022)，因此，本試驗進一步探討不同濃度之神真水 3 號搭配 SH 土壤添加物，以及不同濃度貝萊斯寶對於萎凋病之防治效果，並評估其於不同植株生長時期施用的合適性。

本試驗材料與實驗方式與「農用微生物搭配 SH 土壤添加物對 *Fusarium oxysporum* 引起之萎凋病的防治潛力測試」方法相同，本試驗處理組分為病原菌對照組 (CK)、SH 土壤添加物 (SH) 單獨處理、800 倍稀釋的神真水 3 號搭配 SH 土壤添加物 (800X CL3 + SH)、2000 倍稀釋的神真水 3 號搭配 SH 土壤添加物 (2000X CL3 + SH)、4000 倍稀釋的神真水 3 號搭配 SH 土壤添加物 (4000X CL3 + SH)、3000 倍稀釋的貝萊斯寶 (3000X BACY)、6000 倍稀釋的貝萊斯寶 (6000X BACY)、6000 倍稀釋的貝萊斯寶搭配 SH 土壤添加物 (6000X BACY + SH)。另外，有 2 組處理會於發芽種子播種於穴盤中，育苗

1 週後分別澆灌 15 ml 400 倍稀釋的神真水 3 號 (SI-400X CL3 + SH) 和 6000 倍稀釋的貝萊斯寶 (SI-6000X BACY + SH)，澆灌後 1 週將苦瓜苗移盆至含有 0.007% SH 土壤添加物之培養土的 4 吋盆中，移盆後僅澆灌含 200 倍稀釋的即溶台肥 43 號與 0.01% Tween 80 的自來水，每處理重複 11 次，試驗進行 1 次。當第 1 株苦瓜植株出現萎凋病病徵時，開始每日觀察和紀錄各處理組的萎凋病罹病情形，並依據上一試驗 5 級評分標準搭配下列公式計算植株罹病度，其中 n0 至 n4 為各罹病級別的植株數；N 為總植株數。

$$罹病度\ (Disease\ severity)\ (\%) = \frac{n0 \times 0 + n1 \times 1 + n2 \times 2 + n3 \times 3 + n4 \times 4}{N \times 4} \times 100$$

植株試驗以 CK 罹病度達 80% 以上當天數據呈現，結果顯示 SH 處理組苦瓜萎凋病罹病度較 CK 降低 59%，而 800X CL3 + SH 處理組較 CK 罹病度降低 68%，具有最佳抑制 *F. oxysporum* f. sp. *momordicae* KS0702 引起之苦瓜萎凋病能力，其次為 SI-400X CL3 + SH 處理組，其罹病度相較 CK 降低 59%，與 SH 處理組防治效果相當。另外，2000X CL3 + SH、4000X CL3 + SH 和 6000X BACY + SH 相較 CK 罹病度可分別減少 48%、20% 和 48% (圖 5)。綜合上述結果可知，800 倍稀釋的 CL3 菌株搭配 SH 土壤添加物對防治苦瓜萎凋病具有加乘效果，又發現苦瓜於育苗期澆灌 400 倍稀釋的 CL3 菌株亦具有良好防治苦瓜萎凋病效果，因此後續實驗將進一步探討 CL3 菌株於不同苦瓜種植時期之施用時機與適宜濃度。

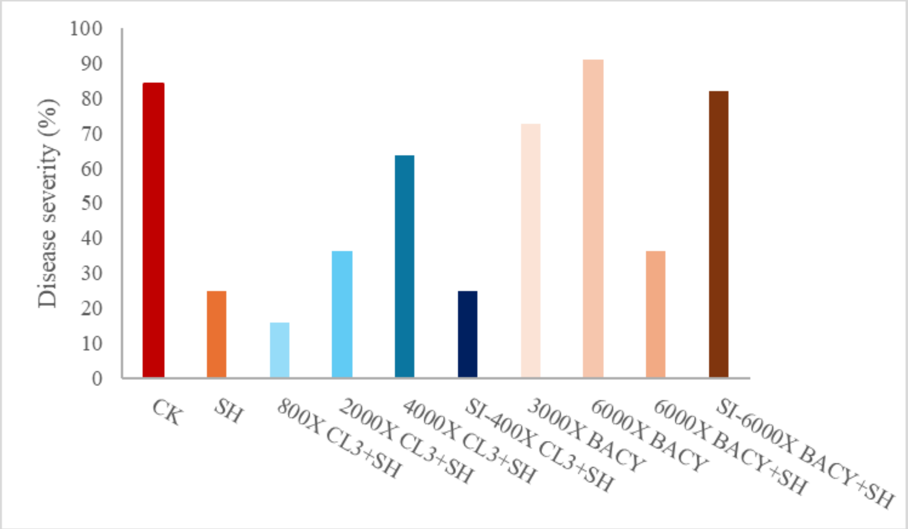

圖 5. 不同濃度市售微生物製劑與 SH 土壤添加物對苦瓜萎凋病罹病度的影響。
Fig.5. Effect of varying concentrations of commercial microbial biological control agents and SH amendment on the disease severity of *Fusarium* wilt in bitter gourd.

結果與討論

Fusarium oxysporum 為一種土傳性病原真菌，廣泛存在於土壤、空氣與水等環境中。儘管其對寄主具高度專一性，但因具有多種分化型，可引起許多經濟作物之萎凋病害，典型病徵為植株葉片黃化萎凋與維管束褐化，感染嚴重時會導致植株死亡，對全球農業造成重大經濟損失 (蘇，2011)。由於 *F. oxysporum* 引起之作物萎凋病一旦發生於栽培期間即難以控制，目前多以輪作、土壤燻蒸與太陽能加熱等方式降低病原菌族群量，或透過種植抗病品種加以預防。然而，在台灣大部分作物尚無針對 *F. oxysporum* 引起之萎凋病的推薦化學防治藥劑，過度依賴藥劑亦可能導致抗藥性病原菌產生與食用部位殘留藥劑的疑慮。因此，開發對環境友善的生物防治資材和施用具有防治病原菌能力的土壤添加物綜合管理萎凋病有其必要性。本研究即評估市售微生物製劑和 *Streptomyces lavenduligriseus* L2 搭配 SH 土壤添加物對萎凋病之防治潛力。

Bacillus species 是一常見的生物防治微生物，其為革蘭氏陽性菌，具備形成內生孢子的能力有助於耐受環境逆境，並能生合成許多有利於植物生長、誘導植物抗病性，及抑制病原菌生長的物質，如 Ryu 等人 2003 年研究指出 *B. subtilis* 產生的 3-羥基-2-丁酮和 2, 3-丁二醇有助於植物調控細胞分裂素 (Cytokinin) 和乙烯 (Ethylene) 以促進生長 (Ryu *et al.*, 2003)；Kumar 等人 2012 年研究發現 *B. subtilis* 可通過氣孔進入葉片，引發阿拉伯芥的誘導性系統抗性 (Induced systemic resistance, ISR) (Kumar *et al.*, 2012)；Fan 等人 2017 年研究顯示 *B. subtilis* 9407 產生的表面素 (Surfactin) 具拮抗 *Acidovorax citrulli* 活性，且對於接種過 *A. citrulli* 的甜瓜幼苗具有防治病害能力 (Fan *et al.*, 2017)。Singh 等人 2021 年研究發現 *B. amyloliquefaciens* S185 可生合成促進植物生長的吲哚乙酸 (Indole-3-acetic acid; IAA)，並定殖於香蕉葉片及根部，且會產生伊枯草菌素 A5 (Iturin A5) 抑制 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 孢子發芽及菌絲生長，綜合上述結果顯示 *B. amyloliquefaciens* S185 可作為防治香蕉萎凋病的參考菌株 (Singh *et al.*, 2021)。

本研究所使用之神真水 3 號為 *B. amyloliquefaciens* CL3 發酵物，已登記可防治花木、草莓、葡萄和蔬菜之灰黴病，謝奉家 2012 年的研究發現 *B. amyloliquefaciens* CL3 每週施用於 *F. oxysprum* f. sp. *cattleyae* 引起的蝴蝶蘭黃葉病植株，持續 3 個月可降低 46% 罹病度 (謝，2012)。本研究結果則顯示每週施用神真水 3 號搭配 SH 土壤添加物可有效抑制苦瓜萎凋病發生，其中，以 400 倍和 800 倍稀釋菌液搭配 SH 土壤添加物處理時，其罹病度與病原菌對照組相比分別降低 75% 和 68%，防治效果優於 SH 土壤添加物單獨處理組 (圖 4 和圖 5)，對峙試驗亦顯示其對 *F. oxysporum* 具有 40% 的菌絲生長抑制率 (圖 2)，上述結果可推測神真水 3 號可能藉由直接抑制病原菌生長防治苦瓜萎凋病。此外，研究結果亦發現於苦瓜育苗期施用 400 倍稀釋的神真水 3 號後，移盆至含有 SH 土壤添加物的培養土中持續以含肥料之自來水澆灌，仍可降低 59% 苦瓜萎凋病罹病度 (圖 5)，顯示施用時機可能為防治關鍵，未來將針對此

一發現繼續探討和確認神真水 3 號搭配 SH 土壤添加物於苦瓜不同生長期最佳施用時機。另一方面，貝萊斯寶使用菌種為 *B. velezensis* BACY，其在本研究中對 *F. oxysporum* 菌絲生長抑制率達 50%，具有最佳拮抗活性 (圖 2)，但於搭配 SH 土壤添加物的植株試驗中對苦瓜萎凋病罹病度僅較病原菌對照組降低 18%，效果不及單純使用 SH 土壤添加物處理組 (圖 4)，以不同稀釋倍數施用後，防治效果亦低於 SH 土壤添加物單獨處理 (圖 5)，因此可排除微生物製劑搭配 SH 土壤添加物導致菌量過高，進而對植株產生負面影響的可能性。綜合不同濃度之神真水 3 號搭配 SH 土壤添加物實驗結果推測，神真水 3 號除了能直接抑制病原菌生長外，亦可能透過誘導植物抗病機制發揮防治效果，較貝萊斯寶更能有效降低苦瓜萎凋病的發生。

Streptomyces species 在現今防治植物病害之微生物製劑研發中被受重視，為革蘭氏陽性菌，可形成菌絲有助於生長及定殖，且會產生斷生孢子有利於耐受極端環境及傳播 (Flärdh and Buttner, 2009)，*Streptomyces* 亦會生合成多種促進植物生長和具抗病性物質，如 Gopalakrishnan 等人 2013 年研究指出 *Streptomyces* sp. CAI-24 和 KAI-32 菌株可以產生 IAA、幾丁質酶 (Chitinase) 和脂肪酶 (Lipase)，對水稻和高粱具有促進生長能力 (Gopalakrishnan *et al.*, 2013)；Hata 等人 2021 年研究顯示 *S. shenzhenesis* TKSC3 和 *Streptomyces* sp. SS8 可藉由誘導植物防禦相關酵素產生，進而防治 *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* 引起的水稻細菌性條斑病 (Hata *et al.*, 2021)；Wang 等人 2022 年研究發現 *Streptomyces* sp. CX32 的培養濾液會導致藍莓潰瘍病菌 *Bo. dothidea* 之細胞膜通透性提升，以及使脂質過氧化的產物－丙二醛 (Malondialdehyde) 含量增加，且可降低藍莓潰瘍病之病斑擴展，此結果表明 CX32 菌株可造成病原菌細胞膜受損達到防治藍莓潰瘍病的效果 (Wang *et al.*, 2022)。Wang 等人 2024 年研究發現 *S. luteoverticillatus* B4 會生合成鐵載體 (Siderophore) 和 IAA 促進甘藍種子發芽和幼苗生長，亦會產生揮發性有機物 (Volatile Organic Compound, VOCs) 抑制 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 菌絲生長及破壞菌絲結構達到防治甘藍萎凋病效果 (Li *et al.*, 2024)。本研究結果則顯示施用農試所湯佳蓉助理研究員所分離出 *S. lavenduligriseus* L2 搭配 SH 土壤添加物可有效防治苦瓜萎凋病，且與 SH 土壤添加物搭配的適用濃度為 25 倍稀釋之 L2 菌株，其罹病度與病原菌對照組相比減少 85%，且防治效果優於 SH 土壤添加物單獨處理組 (圖 5)，對峙試驗亦顯示 *S. lavenduligriseus* L2 對 *F. oxysporum* 具有 42% 的菌絲生長抑制率 (圖 2)，上述結果可推測 *S. lavenduligriseus* L2 可能藉由直接抑制病原菌生長防治苦瓜萎凋病。

SH 土壤添加物由肥料、農業廢棄物和工業副產品所組成，成分為 4.4% 甘蔗渣、8.4% 稻穀、4.25% 蚵殼粉、8.25% 尿素、1.04% 硝酸鉀、13.16% 過磷酸鈣和 60.5% 礦灰，其中礦灰可提升土壤酸鹼值，直接抑制病原菌孢子發芽，且促使尿素在鹼性環境中進行脫氨作用，釋放氨氣殺死土壤中發芽的病原菌孢子；有機質可以改良土壤結構助於有益微生物代謝效率提高，促使有機質分解以提供養分利於植物生長 (黃，2023)。SH 土壤添加物經研究發現於接種過西

瓜蔓割病菌 *F. oxysporum* f. sp. *niveum* 的屏東農友公司農場場域施用，可使 46.7% 發病率減少至 20.1%；在埔里和新社地區 *F. oxysporum* f. sp. *raphanin* 引起之蘿蔔黃葉病嚴重田地施用 SH 土壤添加物可將發病率由 58.3% 降至 20%，若搭配甘藍下位葉和種子消毒綜合防治蘿蔔黃葉病，可將發病率降至 0%，且 SH 土壤添加物中的礦灰和蚵殼成分分別能抑制 34% 和 37% 厚膜孢子發芽，以及促進 28% 和 20% 發芽管分解；SH 土壤添加物混入土壤中 30 天後亦發現土壤中的拮抗菌和腐生菌菌相增加，有助於間接抑制病原菌 (孫，1989)。本研究亦發現單獨施用 SH 土壤添加物能夠有效抑制苦瓜萎凋病罹病度，且與神真水 3 號和 *S. lavenduligriseus* L2 共同施用具有加乘效果 (圖 4 和圖 5)。

綜合本研究結果顯示，神真水 3 號與 *S. lavenduligriseus* L2 均具有抑制 *F. oxysporum* 菌絲生長能力，藉此降低 *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* KS0702 引起之苦瓜萎凋病罹病度；SH 土壤添加物亦能有效抑制 *F. oxysporum* f. sp. momordicae KS0702 引起之苦瓜萎凋病，且與適當濃度的神真水 3 號和 L2 菌株於苦瓜不同種植時期搭配使用，展現加乘防治效果。未來將針對有益微生物和 SH 土壤添加物於植株施用時機進一步探討，以建立萎凋病之最佳綜合防治策略。

謝辭

感謝行政院農業部支持研究經費，並感謝農業試驗所湯佳蓉助理研究員及許育仁先生提供 L2 菌株和相關資料，對本研究順利進行貢獻良多，謹致上最深謝意。

引用文獻

1. 孫守恭. 1989. 土壤添加物在病害防治上之應用. 台中區農業改良場有機農業研討會專集 6:141–155.
2. 湯佳蓉、張碧芳、張道禾、林盈宏、黃振文. 2019. 蕈狀芽孢桿菌防治番茄萎凋病之機制分析平台. 植物醫學 61(1):29–38.
3. 何婉清. 2003. 萎凋病. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局植物保護圖鑑系列 13－洋桔梗保護 (第二刷):55–60.
4. 李豐在. 2005. 土壤傳播性病害之非農藥防治法. 花蓮區農業專訊 54:2–5.
5. 孫守恭、黃振文. 1985. 土壤添加物防治鐮胞菌萎凋病之機制. 植保會刊 27:159–169.
6. 蘇士閔. 2011. 尖鐮胞菌 (*Fusarium oxysporum*) 引起之種傳萎凋型病害. 植物種苗 13(4):27–34.
7. 謝家奉. 2012. 液化澱粉芽孢桿菌防治外銷蝴蝶蘭黃葉病之研發. 農政與農情 237=474:91–94.

8. 黃振文. 2023. 循環利用農業剩餘物研製植物保護產品的加值效應. 臺中區農業改良場特刊 150:57–69.
9. Al-Mutar, D. M. K., N. S. A. Alzawar, M. Noman, D. Li. Azizullah, and F. Song. 2023. Suppression of fusarium wilt in watermelon by *Bacillus amyloliquefaciens* DHA55 through extracellular production of antifungal Lipopeptides. Journal of Fungi 9(3):336.
10. Amini, J. and D. Sidovich. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. Journal of plant protection research.
11. Dean, R., J. A. Van Kan, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P. D. Spanu, J. J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann and J. Ellis. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular plant pathology, 13(4):414–430.
12. Di Pietro, A., M. P. Madrid, Z. Caracuel, J. Delgado-Jarana. and M. I. G. Roncero. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Molecular plant pathology, 4(5).
13. Dimond, A. 1970. Biophysics and biochemistry of the vascular wilt syndrome. Annual review of phytopathology, 8(1):301–322.
14. Fan, H., Z. Zhang, Y. Li, X. Zhang, Y. Duan and Q. Wang. 2017. Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. Frontiers in microbiology, 8, 1973.
15. Flärdh, K. and M. J. Buttner. 2009. *Streptomyces morphogenetics*: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nature Reviews Microbiology, 7(1):36–49.
16. Gopalakrishnan, S., V. Srinivas, M. Sree Vidya and A. Rathore. 2013. Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. SpringerPlus, 2:1–8.
17. Gordon, T. R. 2017. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. Annual review of phytopathology, 55(1):23–39.
18. Hata, E. M., M. T. Yusof and D. Zulperi. 2021. Induction of systemic resistance against bacterial leaf streak disease and growth promotion in rice plant by *Streptomyces shenzhenesis* TKSC3 and *Streptomyces* sp. SS8. The plant pathology journal, 37(2):173.
19. Jeon, C. S., G. H. Kim, K. I. Son, J.-S. Hur, K.-S. Jeon, J.-H. Yoon and Y. J. Koh. 2013. Root rot of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. The plant pathology journal, 29(4):440.
20. Köhl, J., R. Kolnaar and W. J. Ravensberg. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy.

Frontiers in plant science, 10:845.
21. Kawanishi, T., S. Uematsu, K. Nishimura, T. Otani, C. Tanaka-Miwa, H. Hamamoto and S. Namba. 2009. A new selective medium for *Burkholderia caryophylli*, the causal agent of carnation bacterial wilt. Plant pathology, 58(2):237–242.
22. Kawicha, P., J. Nitayaros, P. Saman, S. Thaporn, T. Thanyasiriwat, K. Somtrakoon, K. Sangdee and A. Sangdee. 2023. Evaluation of soil *Streptomyces* spp. for the biological control of *Fusarium* wilt disease and growth promotion in tomato and banana. The plant pathology journal, 39(1):108.
23. Kumar, A. S., V. Lakshmanan, J. L. Caplan, D. Powell, K. J. Czymmek, D. F. Levia and H. P. Bais. 2012. Rhizobacteria *Bacillus subtilis* restricts foliar pathogen entry through stomata. The Plant Journal, 72(4):694–706.
24. Li, Y., G. Wang, T. Rao, Y. Chen, X. Tan and E. Li. 2024. A potential biocontrol and growth-promoting agent *Streptomyces luteoverticillatus* B4 for managing cabbage *Fusarium* wilt and cucumber *Alternaria* leaf blight. Physiological and Molecular Plant Pathology, 134, 102440.
25. O'Callaghan, M., R. A. Ballard and D. Wright. 2022. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. Soil Use and Management, 38(3):1340–1369.
26. Pacios-Michelena, S., C. N. Aguilar González, O. B. Alvarez-Perez, R. Rodriguez-Herrera, M. Chávez-González, R. Arredondo Valdés, J. A. Ascacio Valdés, M. Govea Salas and A. Ilyina. 2021. Application of *Streptomyces* antimicrobial compounds for the control of phytopathogens. Frontiers in Sustainable Food Systems, 5, 696518.
27. Ploetz, R. C. 2015. Fusarium wilt of banana. Phytopathology, 105(12):1512–1521.
28. Pullman, G. and J. DeVay. 1982. Epidemiology of *Verticillium* wilt of cotton: a relationship between inoculum density and disease progression. Phytopathology, 72(5):549–554.
29. Ryu, C.-M., M. A. Farag, C.-H. Hu, M. S. Reddy, H.-X. Wei, P. W. Paré and J. W. Kloepper. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(8):4927–4932.
30. Singh, P., J. Xie, Y. Qi, Q. Qin, C. Jin, B. Wang and W. Fang. 2021. A thermotolerant marine *Bacillus amyloliquefaciens* S185 producing iturin A5 for antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Marine Drugs, 19(9):516.
31. Stewart, F. C. 1897. A bacterial disease of sweet corn. New York Agricultural Experiment Station.
32. Sun, S. K. and J. Huang. 1983. A new *Fusarium* wilt of bitter gourd in Taiwan.

Plant Disease, 67(2):226–227.
33. Villarreal-Delgado, M. F., E. D. Villa-Rodríguez, L. A. Cira-Chávez, M. I. Estrada-Alvarado, F. I. Parra-Cota and S. d. l. Santos-Villalobos. 2018. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. Revista mexicana de fitopatología, 36(1):95–130.
34. Wang, H., L. Fu, J. Meng, R. Ding, Y. Wang, X. Wang, C. Han, L. C. Li and Zhu. 2022. Antagonistic activity and biocontrol effects of *Streptomyces* sp. CX3 cell-free supernatant against blueberry canker caused by *Botryosphaeria dothidea*. Crop Protection, 162, 106072.
35. Wu, C.-C., Y.-M. Shen, Y.-C. Teng and W.-H. Chung. 2023. First report of lisianthus wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. eustomae in Taiwan. Crop Protection, 171, 106298.

Evaluation of the Efficacy of Agricultural Microorganisms in the Control of *Fusarium* Wilt of Bitter Gourd

Sing-Yu Chen, Su-Chiu Hung, Ying-Huey Cheng, and Li-Yu Tsao

Department of Plant Protection and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture.

ABSTRACT

Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum*, is a major threat to many crops, leading to severe yield losses worldwide. In Taiwan, no specific chemical fungicides are currently recommended for its management, and long-term use of chemicals may lead to pathogen resistance and food safety concerns. This study evaluated the efficacy of a commercial microbial agent *Bacillus amyloliquefaciens* CL3 and *Streptomyces lavenduligriseus* L2, in combination with SH soil amendments, for the management of *Fusarium* wilt in bitter gourd. Antagonism assays showed that *B. amyloliquefaciens* CL3 and *S. lavenduligriseus* L2 inhibited *F. oxysporum* mycelial growth by 40% and 42%, respectively. Greenhouse experiments revealed that SH combined with 400-fold and 800-fold dilutions of B. amyloliquefaciens CL3 reduced disease severity by 75% and 68%, while SH combined with 10-fold and 25-fold dilutions of S. lavenduligriseus L2 both achieved 85% reduction. All of these treatments outperformed SH alone. Application of *B. amyloliquefaciens* CL3 one week before transplanting reduced disease severity by 59%, ranking second only to weekly drenching with an 800-fold dilution applied after transplanting. These findings suggest that combining microbial agents with SH soil amendments provides effective and environmentally friendly control of *Fusarium* wilt in bitter gourd. Further studies will focus on optimizing application timing to establish a practical and sustainable management strategy.

Key words: *Fusarium* wilt, biological control, *Bacillus amyloliquefaciens* CL3, SH soil amendment, *Fusarium oxysporum*, *Streptomyces lavenduligriseus.*